

高濃度 Dimethylformamid 溶液中でのグルテニンの溶存状態

柴田 亜樹, 濱渦善一郎
(武庫川女子大学生活環境学部食物栄養学科)

Behavior of Glutenin in Concentrated Dimethylformamide

Aki Shibata and Zen-ichiro Hamauzu

Department of Food Science and Nutrition,
School of Human Environmental Sciences,
Mukogawa women's University, Nishinomiya 663-8558, Japan

Wheat flour is used to make several kinds of food and other materials. It is considered that gluten protein(Gt), the major protein in wheat flour, plays an important role to food processing of wheat flour. Gt consists of glutenin(Gn)and gliadin(Gd), and the viscoelasticities of these proteins contribute to the properties of flour. But it is not revealed yet what contributes to the properties. The hydrodynamic properties of Gn in good solvent were investigated to reveal the dissolving state in that solvent through viscometry. From the results of viscosity, turbidity and differential spectrum, 6M dimethylformamide(pH4)is found to be a good solvent for Gn.

緒 言

小麦粉は、[品種]の違いによる品質特性を生かして多くの食品に加工されているが、食品以外にもいろいろな産業で利用されている。小麦の主要たんぱく質であるグルテン(Gt)は、グルテニン(Gn)とグリアジン(Gd)から成り、独特の粘弾性を示し、この性質が小麦の用途に大きく関与している。小麦の主要たんぱく質の研究は、[品種]の特徴を明らかにする上でも重要であるが、難溶性であることから、それぞれの特徴的な性質がどのような構造に起因しているのかは、未だ明らかにされていない。

従来グルテンの研究には、pH3 付近の酢酸、乳酸アルミニウム緩衝液などが用いられ、また変性剤の存在下での研究報告^{2~6)}が多くなされてきたが、性質を構造的に検討するためには、グルテンたんぱく質をできるだけインタクトな状態で溶解できる溶媒と条件等を検討する必要がある。我々は、予備的な実験から高濃度 N, N-Dimethylformamide(DMF)が、分子状態を研究する上で極端な変性を起こさな

い良溶媒であるという結果を得た。そこで、流体力学を含む物理化学的見地から、会合性に富むサブユニットの重合体であるグルテニン(Gn)について、DMF 溶液中の挙動を調べてみた。

実験方法

I. 試料

小麦粉は、奥本製粉株式会社より提供された強力粉ヘルメスを使用した。

小麦粉を n-ブタノールで脱脂後、Jones らの方法に従ってグルテンを調製した。得られたグルテンから Woychik らの方法でグルテニン(Gn)を分離した後、0.1N 酢酸溶液を用いて分散させたものを実験に使用した。

II. 測定方法

1)濁度測定:0.1%Gn を含む 1~7M 濃度の DMF 溶液に対して、波長 250nm~600nm における吸収を測定した。また同様に、酢酸緩衝液を用いて 6M DMF 溶液の pH を 4~10 に調整した試料の吸収を測定した。

測定には、BECKMAN DU-7000 分光光度計を使用した。

2) 差スペクトル測定: 0.1% Gnを含む6M DMF溶液を基準として、0.02M~0.1M濃度のNaClをそれぞれ添加した試料について、270nm~300nmまでの吸光度を測定⁹⁾した。

3) 粘度測定: 0.05%, 0.1%, 0.15%, 0.2%濃度のGnを含む6M DMF溶液に、0.02M~0.1M濃度のNaClをそれぞれ添加した試料についてOstwald-viscometerを用いて30℃における粘度を測定した。

4) 極限粘度: 極限粘度は、Gnの濃度に対して還元粘度の逆数をプロットし、濃度0への外挿値から求めた。¹⁰⁾

5) 軸比: Simha^{11~13)}は、高分子が回転楕円体の形をとっている場合、極限粘度から次式を用いて軸比が求められることを提唱している。

扁長回転楕円体の場合:

$$[\eta] = \frac{P^2}{15(\ln 2P - 3/2)} + \frac{P^2}{5(\ln 2P - 1/2)} + \frac{14}{15} \quad (P > 10)$$

扁平回転楕円体の場合:

$$[\eta] = \frac{16P}{15 \tan^{-1} P} \quad (P > 10)$$

$[\eta]$: 極限粘度 P : 軸比

Gn分子に対しては扁長回転楕円体と仮定して軸比を算出した。

6) 円二色性の測定: 0.1% Gnを含む6M DMF溶液に対して、0.02M~0.1M濃度のNaClをそれぞれ添加した試料の円二色性¹⁴⁾を、日本分光 J-720型円二色性分散計で測定した。

結 果

0.1% Gnを含む1M~7M濃度のDMF溶液の濁度を測定した結果、DMF濃度が高くなるに従って、僅かながら濁りは低下する傾向を示し、6M DMF濃度付近で安定した吸収曲線が得られた。また、pHの差による影響も僅かにあったが、弱酸性から中性域で安定したため、以下の実験には、6M DMF溶液(pH4)を基準として検討を行った。塩濃度の変化による差スペクトルを測定した結果をFig.

1.に示した。

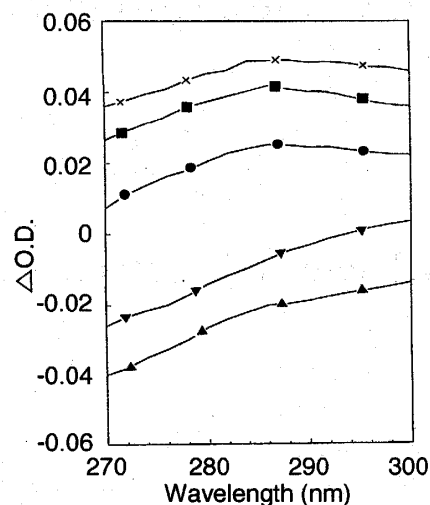


Fig. 1. Difference spectrum

Reference : 6M DMF+0.1%Gn

Sample : 6M DMF+0.1%Gn

concentration of NaCl

—▲— : 0.02M; —▼— : 0.04M;

—●— : 0.06M; —■— : 0.08M;

—×— : 0.10M;

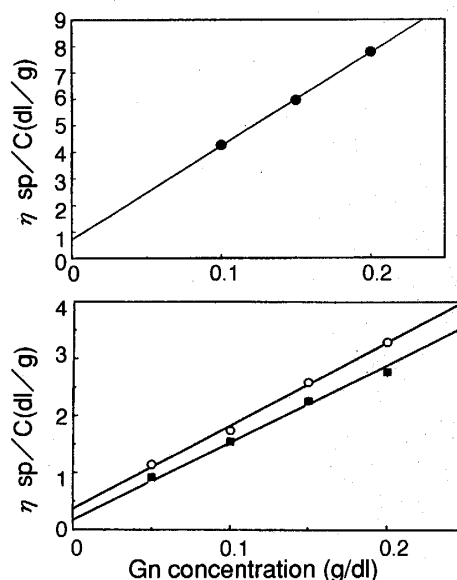


Fig. 2. Plot of η_{sp}/C vs. Gn concentration

Solvent : 6M DMF

Sample : 6M DMF+NaCl

concentration of NaCl

—●— : 0M, —○— : 0.02M,

—■— : 0.04M~0.1M

この結果から、僅かながら red shift を示し、塩濃度が高くなるに従って 286nm での値が大きくなる傾向が見られた。

粘度の測定で得られた極限粘度 (Fig. 2.) は、塩濃度 0M では 80cc/g, 0.02M では 40cc/g, 0.04M~0.1M では 20cc/g となった。これらの値から Simha の式を用いて軸比を算出し、粘度の結果とともに Table 1. に示した。

Table 1. Intrinsic viscosity and axial ratio

NaCl (M)	intrinsic viscosity (cc/g)	axial ratio - Prolate -
0	80	13
0.02	40	9.6
0.04	20	7.2
0.06	20	7.2
0.08	20	7.2
0.10	20	7.2

考 察

グルテンたんぱく質の溶解性が塩の存在下で極端に低下するのは、塩による会合が原因であるが、1M~7M と、DMF 濃度が高くなるに従って、濁りは僅かながら低下し、また塩を添加した状態ではさらにその傾向が強くなったことから、DMF 溶液が塩により会合したグルテン分子の解離に大きく関与していることが示唆された。また、極限粘度が塩の添加により、急激に低下したことは (Fig. 2.), 分子の収縮によるものであると思われる。また極限粘度から Simha の式を用いて、軸比を扁長回転楕円体として算出した結果、塩濃度 0M で [13], 0.02M で [9.6], 0.04M~0.1M では [7.2] という値を得たことから、分子が収縮したという推定を支持していると考えられた。塩濃度が 0.04M 以上の値には差が見られなかったこと、および濁度の結果から微量の塩の存在下で DMF 溶液がグルテン分子の解会合に寄与しているのではないかと考えられた。差スペクトルの測定結果では、塩の添加により 286nm 付近で僅かながら red shift を起こしたのは、グルテン分子内部の発色団残基部分¹⁵⁾に水素結合が起こったためではないかと思われたが、これは DMF 溶液の効果によるものではなく、塩による効果を大きく受けての分子の収縮によるものと推定された。以上のことから、物理化学的な溶液論として、DMF 溶液中のグルテン分子は、溶解度が高く、微量の塩の存在下でコンパクトな構造をとり、濁りも小さいことから、条件によっては極端な変性が起こらず、溶存状態は安定であると推定された。これらの結果から、グルテン分子をインタクトな状態で分析し、構造を調べる際、分子を単分子状態に溶解する溶媒として、DMF は有効な溶媒であると考えられる。

円二色性の測定結果からは構造の変化の特徴を知

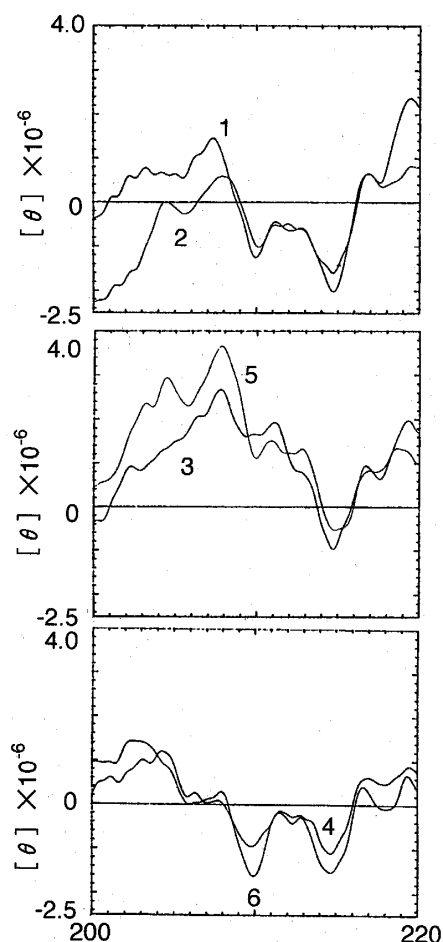


Fig. 3. Circular dichroism of Gn
Solvent : 6M DMF
Sample : 6M DMF + 0.1% Gn
concentration of NaCl
1: 0M, 2: 0.02M, 3: 0.04M
4: 0.06M, 5: 0.08M, 6: 0.10M

円二色性の測定では、規則性はないものの、塩濃度の違いにより、特徴的な曲線が得られた。(Fig. 3.).

るには至らなかったが、6M DMF 溶液中のグルテニンの挙動とともにさらに検討する必要がある。

要 約

小麦の主要たんぱく質であるグルテンは、グルテニンとグリアジンから成り、独特の粘弾性を示し、小麦の用途に大きく関与しているが、難溶性であることから、この性質がどのような構造に起因しているのかは未だ明らかにされていない。本研究では流体力学的見地から、グルテニンに対する有効な溶媒中での溶存状態を通して一性質を知ることがを目的に実験を行った。

その結果、6M DMF (pH4) 溶液がグルテニンの分子状態を研究する上で極端な変性を起こさない、良溶媒であるという結果を得た。

文 献

- 1) Y. Pomerantz: 最新の穀物科学と技術, (1992), パンニュース社
- 2) R.W. Jones, G.E. BABCOCK, N.W. Taylor and T.R. SENTI: *Arch. Biochem. Biophys.*, **96**, 252(1962)
- 3) R.W. Jones, G.E. Babcock, N.W. Taylor and F.R. Senti: *Arch. Biochem. Biophys.*, **104**, 257(1964)
- 4) T. Mita and D. Yonezawa: *Agr. Biol. Chem.*, **35**, 1792(1971)
- 5) Z. Hamauzu and D. Yonezawa: *Agr. Biol. Chem.*, **36**, 2421(1971)
- 6) Hamauzu and D. Yonezawa: *Agr. Biol. Chem.*, **42**, 1283(1978)
- 7) R.W. Jones, N.W. Taylor and F.R. Senti: *Arch. Biochem. Biophys.*, **84**, 363(1959)
- 8) J.H. Woychik, J.A. Boundy and R.J. Dimler: *Arch. Biochem. Biophys.*, **94**, 477(1961)
- 9) 伊勢村寿三, 田仲二郎, 野田春彦, 宮沢辰雄共編: 新しい生物物理化学研究法(下), 98-106(1967), 化学同人
- 10) 田仲二郎, 和田昭充: 物理的測定法Ⅱ, 3-6(1968), 吉岡書店
- 11) P. ALEXANDER and R.J. BLOCK: *A LABORATORY MANUAL OF ANALYTICAL METHODS*
- 12) C. Tanford, "Viscosity"(T). *Physical Chemistry of Macromolecules*, (John Wiley & Sons, Inc), Chap. 6. (1961).
- 13) R. Simha, "The Influence of Brownian Movement on the Viscosity of Solutions"(T). *J. Phys., Chem* **44**, 25(1940).
- 14) 浜口浩三, 武貞啓子著: 蛋白質の旋光性, (1988), 学会出版センター